Münster i/W. 1934. No 65 Med Diss.

Aus der Klinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten
der Medizinischen Akademie in Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. Schreus

Über Fehlerquellen beim Nachweis von Mikroorganismen im Nabelschnurblut unter besonderer Berücksichtigung der Benedek'schen Spalthefebefunde.

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Würde eines doctor medicinae
durch die Medizinische Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität zu Münster
in Gemeinschaft mit
der Medizinischen Akademie in Düsseldorf

vorgelegt von

HANS WILHELM HOLZ
aus Düsseldorf

19 NOLTE 34

DISSERTATIONSVERLAG G. H. NOLTE DÜSSELDORF

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Wesfälischen Wilhelms-Universität und der Medizinischen Akademie in Düsseldorf.

gez. Schmidt
Rektor der Medizinischen Akademie in Düsseldorf

gez. Esch
Dekan der Medizinischen Fakultät Münster

gez. Engelhardt
1. Berichterstatter

gez. Stühmer
2. Berichterstatter

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Als im Jahre 1926 Benedek die erste Nachricht über einen von ihm gefundenen pathogenen Schizosaccharomyces nov. spec. veröffentlichte, wurde dieses Ereignis mit größter Aufmerksamkeit aufgenommen. Kannte man doch bisher nur vier Spalthefearten:

1. Schizosaccharomyces Pombe, Lindner 1893;
2. Schizosaccharomyces octosporus, Beijerinck 1894;
3. Schizosaccharomyces asporus, Eykmann 1894;
4. Schizosaccharomyces mellacei, Jörgensen 1895,

deren völlige Apathogenität und streng örtlich begrenztes Vorkommen lediglich in tropischen Ländern nicht daran denken ließ, daß einer Spalthefe in der medizinischen Pathologie als Krankheitserreger eine Bedeutung zukomme.

In kürzester Zeit gelang es jedoch Benedek, aus den Hautaffektionen dreier verschiedener Krankheitsbilder ein und dieselbe Spalthefeart zu züchten. Es handelte sich um folgende Fälle:

1. Eine der Erosio interdigitalis blastomycetica (Fabry) ähnliche Erkrankung beider Hände bei einem Bäckerlehrling. Mit der Angabe, hier aus geschlossenen Efflorescenzen seine Spalthefe in Reinkultur gewonnen zu haben, bezeichnete Benedek diese Hauterkrankung als „Schizosaccharomycosis superf. desquamativa et erosiva interdigitalis". In gleicher Weise habe er aus einer Preßhefe, mit der der Patient täglich in Berührung gekommen sei, die Spalthefe isolieren können.

2. Intertrigoartige Erkrankung beider Axillen und der Genitalregion. Auch hier habe er seinen neuen Erreger in Reinkultur ohne irgendwelche Verunreinigungen züchten können. Mit der Angabe, somit auch in diesem Fall die Ätiologiefrage restlos geklärt zu haben, führte Benedek den Begriff der Schizosaccharomycosis intertriginosa in die Nomenklatur der Dermatosen ein.

3. Trockene, schuppende Hautaffektion in beiden Axillen und in der Genitalregion, mit multipler Absceßbildung in der Subcutis. Auch dieses Krankheitsbild bezeichnete Benedek als Schizosaccharomykose, nachdem er aus dem Absceßeiter seine Spalthefe gezüchtet hat.

In weiteren Arbeiten berichtet Benedek über positive Inokulationsversuche beim Menschen mit der Reinkultur des Schizosaccharomyces nov. spec., ferner über bestätigende immunbiologische und histopathologische Untersuchungen und positive Tierversuche.

Ermutigt durch diese seine Anschauungen bejahenden Ergebnisse untersucht Benedek die wichtigsten Dermatosen und stellt fest, daß die große Gruppe der von Unna unter den Begriff des

Ekzema seborrh. zusammengefaßten Krankheitsbilder durch die von ihm entdeckte Spalthefe hervorgerufen seien. Für diese in ihrer Ätiologie bisher ungeklärten Hauterkrankungen führt er den Namen „Schizosaccharomycosis hom." in die Nomenklatur ein. Weitere Versuchsreihen Benedeks beschäftigen sich dann mit der mikroskopischen und kulturellen Trennung seiner Spalthefe in 1. Bluttyp und 2. Hauttyp, sowie mit der Beweisführung für seine Behauptung, Spalthefe im strömenden Blut bei hautkranken und auch anscheinend hautgesunden Patienten in einer großen Anzahl von Fällen nachgewiesen und aus diesem isoliert gezüchtet zu haben.

Als Bestätigung der ätiologischen Rolle seiner Spalthefe wird ferner angeführt, daß der Nachweis einer spezifischen Gewebsallergie nach intrakutaner Injektion von Auto- oder Heterovakzinen, hergestellt aus Spalthefestämmen und die Bildung von spezifischen humoralen Antikörpern von ihm erbracht worden sei.

Schließlich behauptet Benedek mit aller Bestimmtheit, daß es unter Einhaltung der von ihm angegebenen Züchtungsbedingungen möglich ist, aus unverletzten, durch Cantharidenpflaster hervorgerufenen Epidermisblasen die Spalthefe kulturell und mikroskopisch nachzuweisen.

In einer seiner letzten Veröffentlichungen (VIII. Internat. Kongreß Kopenhagen S. 563) brachte Benedek als Abschluß seiner zahlreichen, die Existenz und Pathogenität seiner Spalthefe stets bejahenden Arbeiten folgende Zusammenfassung seiner Ergebnisse von außerordentlicher Wichtigkeit:

„Es ist mir gelungen, den Nachweis zu führen, daß der Schizosaccharomyces hom. im Nabelschnurblut, mitunter in einer kaum glaublichen Menge, in vegetativen Formen, z. T. in Makrophagen phagozytiert, bereits vorhanden ist. Die bisher untersuchten 20 Fälle waren mikroskopisch und kulturell stets positiv. Damit ist auch einwandfrei erwiesen, daß

1. der Schizosaccharomyces hom. auf plazentarem Wege von der Mutter auf das Kind übertragen wird;

2. die Infektion des Organismus noch vor der Geburt intrauterin erfolgt;

3. der Schizosaccharomyces hom. ein ständiger Parasit des homo sapiens ist."

Bevor ich nun über die Ergebnisse der von Engelhardt und mir in 2 Untersuchungsreihen (Engelhardt Fall 1 bis 25; Holz Fall 26 bis 57 unter besonderer Berücksichtigung der Verunreinigungsmöglichkeiten) unternommenen Nachprüfung der Benedekschen Nabelschnurblutbefunde berichte, soll kurz gesagt werden, welche Stellungnahme die bisherigen Veröffentlichungen Benedeks in der medizinischen Literatur gefunden haben.

Eine Reihe von Autoren (Kadisch, Keil, Reiss, Riecke, Unna und Urbach) konnten in ihren Arbeiten die Spalthefebefunde Benedeks — insbesondere die Möglichkeit, aus se-

borrhoisch-ekzematösen Efflorescenzen den Schizosaccharomyces nov. spec. zu isolieren und zu züchten — in großem Ausmaß bestätigen.

In ausgesprochenem Gegensatz hierzu standen Bernstein, Biberstein, Buschke und Epstein, denen es niemals gelang, aus seborrhoischem Schuppenmaterial die Benedek'sche Spalthefe — färberisch oder kulturell — nachzuweisen, geschweige die Ätiologiefrage des Ekzema seborrh. auf diesem Wege zu klären.

Besonders bemerkenswert waren in diesem Zusammenhang die Ergebnisse von Engelhardt und Schneider, die — bei ausführlicher Nachprüfung durch wiederholte Züchtungsversuche — bis zu 95% positive Spalthefebefunde erhielten, gleichzeitig aber auch den Nachweis führen konnten, daß dieses Ergebnis auf eine sicher stattgefundene Laboratoriumsinfektion zurückzuführen war. Die Möglichkeit der Laboratoriumsinfektion wurde von Kadisch bestätigt.

Weiterhin berichteten Engelhardt und Nicolai an Hand einer großen Versuchsreihe von 277 am Menschen ausgeführten Impfungen über die Unmöglichkeit, mit einer Reinkultur des Schizosaccharomyces hom. ein als Ekzem seborrh. anzusprechendes Krankheitsbild zu erzeugen. Die Unmöglichkeit wird von Benedek später selbst zugegeben und erklärt durch das immunbiologische Verhalten der Menschenhaut.

Die von Benedek angegebenen positiven immunbiologischen Versuchsergebnisse wurden in mehreren Arbeiten (Engelhardt und Geisler, Bernstein, Biberstein und Epstein) nachgeprüft. Sie ergaben jedoch in keinem Fall ein sicher verwertbares, bestätigendes Resultat.

Über Spalthefebefunde im strömenden Blut, Cantharidenblaseninhalt und Nabelschnurblut haben Engelhardt, Braconier, Weber und Holz zahlreiche Versuchsreihen durchgeführt. Die kritische Beurteilung dieser eingehenden Nachuntersuchungen ergab bezüglich der Spalthefebefunde im strömenden Blut sowie im Inhalt der durch Cantharidenpflaster hervorgerufenen Hautblasen in keiner Weise eine Bestätigung der Benedek'schen Ergebnisse. Die Spalthefe soll nach Benedek bis zu 100% im Nabelschnurblut färberisch und kulturell nachweisbar sein.

Im folgenden sollen nun die an Hand von 32 Fällen gewonnenen Ergebnisse kurz niedergelegt werden.

Die strenge Einhaltung der von Benedek angegebenen Züchtungsbedingungen war selbstverständlich. Mehrfach betont Benedek in seinen Arbeiten, daß die Züchtung seiner Spalthefe aus dem strömenden Blut nur in flüssigen Medien möglich ist. Zur Anzüchtung kam daher nur die von Benedek empfohlene 5% Glukosebouillon (rohe Glukose Merck, Standard Nährbouillon I Merck) zur Verwendung, zur Überimpfung vom flüssigen auf den festen Nährboden (Platte und Schrägagar) der von Benedek angegebene 8%ige Glukoseagar:

Rohe Glukose Merck	80,0
Pepton Merck	10,0
Agar	20,0
Aqu. dest.	1000,0

In gleicher Weise berücksichtigte ich die auf dem Internat. Kongreß 1930 in Kopenhagen von B e n e d e k geforderte Zwischenschaltung einer Citratlösung (Natr. citric. 0,6, Natr. Chlorat. 0,9, Aqu. dest. ad. 100,0), da nach seinen Erfahrungen dem Blut bezw. Serum ein wesentlicher entwicklungshemmender Einfluß auf das Wachstum von Mikroorganismen — insbesondere seiner Spalthefe — zuzusprechen sei.

Technik:

Die Herstellung der sterilen Nährbouillon, des Glukoseagars und der Citratlösung sowie die exakte Sterilisierung der Petrischalen, Citrat-, Bouillon- und Schrägagarröhrchen wurde von mir selbst unter genauester Einhaltung der von B e n e d e k geforderten Bedingungen durchgeführt. In der hiesigen Frauenklinik wurden dann — nach Abnabelung des Kindes mit steriler Schere — 10 ccm Nabelschnurblut aus dem plazentaren Teil der Nabelschnur bei noch nicht gelöster Placenta in ein mit der gleichen Menge steriler Citratlösung gefülltes Centrifugierglas gegeben und mit einem sterilen Wattepfropfen verschlossen. Das Centrifugieren wurde in den meisten Fällen sofort nach der Entnahme, in wenigen Fällen nach einer Aufbewahrungszeit von einigen Stunden im Eisschrank vorgenommen. Nach der Ausschleuderung war dann die Bildung von 3 deutlich von einander abgrenzbaren Schichten zu erkennen:

1. als oberste Schicht das durch die Verdünnung mit der Citratlösung etwas schwächer gefärbte Blutserum,

2. die meist zusammenhängende, an ihrer weißlich-gelben Farbe deutlich erkennbare Leukocytenschicht,

3. die bodenständige Erythrocytensäule.

In jedem einzelnen Fall wurde nun folgendermaßen vorgegangen. Zuerst — nach Einfetten des Centrifugierglasrandes — Abgießen des Serum-Citratgemisches. Um nun nicht durch Wirbelbildung beim Aufrichten des Glasröhrchens die Leukozytenschicht zu zerstören, entnahm ich sofort nach Abgießen des Serums — also ohne das Glas wieder aufzustellen — mit einer Platinöse Teile aus der Leukozytenschicht und verrieb diese auf 5 Objektträger. Anschließend beimpfte ich in gleicher Weise eine Platte mit 8%igem Glukoseagar. Die nur stellenweise mit der Platinöse zerstörte Leukozytenschicht wurde möglichst ohne Erythrocyten in ein mit 30 ccm 5%iger Glukosebouillon gefülltes Röhrchen übergegossen und mit der beimpften Agarplatte in dem auf eine Temperatur von 27° eingestellten Thermostaten bebrütet.

A. Mikroskopischer Nachweis.

Von jedem einzelnen Fall wurden 5 Präparate aus der Leukocytenschicht zur mikroskopischen Untersuchung angefertigt. Hierzu dienten zweierlei Objektträger 1. fabrikneue, in hochprozentigem Alkohol aufbewahrte, 2. mehrfach benutzte, mit den üblichen Methoden gereinigte, nicht steril aufbewahrte Objektträger. Nach Art des Objektträgers und Färbetermins waren diese 5 Ausstrichpräparate folgendermaßen zusammengestellt:

Präparat a) auf neuem Objektträger, nach 8 Tagen gefärbt
„ b) „ „ „ sofort gefärbt
„ c) „ „ „ „ „
„ d) „ gebrauchtem „ „ „
„ e) „ „ „ „ „

Zur Färbung kam nach Benedeks Vorschrift die kombinierte May-Grünwald-Giemsa-Methode in Anwendung. Sämtliche Präparate wurden dann durchschnittlich von 3 Untersuchern je 3—5 Minuten einer eingehenden Durchsicht unterzogen. Hierbei wurden wegen des von Benedek häufig betonten polymorphen Charakters der Spalthefe nicht nur verdächtige, sondern alle auch nur annähernd ähnliche Gestalt aufweisenden Elemente vermerkt. Diese Befunde sind in nachstehender, sämtliche 57 Fälle erfassenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 1.

Fall Nr.	sofort gefärbt:	Neue Objektträger nach 8 Tagen gefärbt:	Alte Objektträger sofort gefärbt:
2	—	2 Stäbchen	2 Stäbchen
8	—	1 Stäbchen	—
12	—	1 Stäbchen	—
13	—	1 Stäbchen	—
20	1 blaue ovale Hefeform	—	—
21	—	1 Stäbchen	—
22	—	—	1 blaue ovale Hefeform
27	—	2 Stäbchen	—
28	—	1 Stäbchen	—
29	—	3 Stäbchen	—
31	—	1 Stäbchen	—
33	—	Schimmelsporen	—
34	—	1 blaue ovale Hefeform	—
36	—	—	Schimmelsporen
39	—	1 Stäbchen	—
40	—	1 plumpes ovales Gebilde (Hefe?)	—
42	—	Schimmelsporen	—
43	1 Stäbchen	Schimmelsporen	—
50	—	1 Stäbchen	—
54	—	Hefeformen	—
56	—	1 Stäbchen	—
57	1 Stäbchen	—	—
	3 = 5,26%	18 = 31,5%	3 = 5,26%

Eindeutig geht aus diesen Befunden hervor, daß von einer hundertprozentigen färberischen Nachweismöglichkeit der Spalthefe im Nabelschnurblut, selbst unter Berücksichtigung sämtlicher irgendwie als bakterielle Elemente verdächtigen Gebilde, nicht die Rede sein kann. Darüber hinaus konnten wir in keinem Fall, selbst bei den in unseren Ausstrichen festgestellten bazilliformen Gebilden, die eine kleine und zierliche Gestalt aufwiesen, mikroskopisch einwandfrei die Identität mit der in den Benedek'schen Testpräparaten in großer Menge zu findenden, wesentlich größeren und plumpen Form der Spalthefe nachweisen.

Außerdem gab uns — was besonders in der Frage der Verunreinigungsmöglichkeiten und damit der Fehlerquellen wichtig erschien — die vorstehende Tabelle folgenden interessanten Aufschluß: In den 8 Tage offen an der Luft liegen gebliebenen und dann erst gefärbten Präparaten fanden sich nämlich bei 18 von 57 Ausstrichen, d. h. in 31,5% sämtlicher Fälle ganz vereinzelt die oben erwähnten bakteriellen Gebilde und anderen Elemente (Hefen, Schimmelsporen), während in den sofort nach dem Trocknen gefärbten Ausstrichen — wider Erwarten ohne Unterschied, ob alter, nicht steriler oder fabrikneuer, keimfrei gemachter Objektträger — nur bei 3 von 57 Fällen, d. h. in 5,26% Mikroorganismen nachzuweisen waren. In den erst nach 8 Tagen gefärbten Präparaten wurden also sechsmal häufiger irgendwelche Mikroorganismen festgestellt als in den sofort gefärbten. Hierbei wäre noch besonders zu berücksichtigen, daß sich dieser zahlenmäßig festgelegte Unterschied von 1:6 noch verdoppeln, d. h. auf 1:12 erhöhen würde, wenn wir — wie bei den sofort gefärbten Ausstrichen auf neuem Objektträger — statt eines zwei Präparate erst nach 8 Tagen gefärbt und untersucht hätten.

Bei der Frage, wie die in unseren Ausstrichen festgestellten bakteriellen Gebilde zu erklären sind, dachten wir in erster Linie an die Möglichkeit des Auffliegens fremder Luftkeime, die sich durch besonders starke Sporenstreuung und hohe Widerstandskraft (insbesondere Hitzeresistenz) auszeichnen und die in jedem Untersuchungsraum vorhanden sind. Eine weitere Verunreinigungsmöglichkeit ergab sich aus folgender Feststellung: Auf fast allen der 8 Tage offen an der Luft liegen bleibenden Ausstrichen sahen wir schon nach kurzer Zeit eigentümliche, runde, etwa hirsekorngroße Aussparungen auftreten, die mit Sicherheit durch Ausfressen der Blutschicht durch Mücken (Stubenfliege!) an diesen Stellen entstanden waren; nach der Färbung fanden sich bei der mikroskopischen Untersuchung vorwiegend hier die oben erwähnten bakteriellen Gebilde, insbesondere Schimmelpilze, Hefen und Staphylokokken.

B. Kultureller Nachweis.

Die Art der Versuchsanordnung geht am besten aus dem folgenden Schema des Untersuchungsprotokolls (Tabelle 2), das bei jedem einzelnen Fall angelegt wurde, hervor:

Schema des Untersuchungsprotokolls.

Fall 41:
Mutter Name: NN.
Anamnese: o. B. Mutter ohne Hauterkrankung.
Kind geb. 1. X. 31. Blut zentrifug. 1. X. 31 sofort nach Abnabelung.

Blutbilder: angefertigt am 1. X. 31.
a) neuer Objektträger, erst nach 8 Tagen gefärbt: am 8. X. 31
b) „ „ sofort gefärbt
c) „ „ „ „
d) gebr. „ „ „ } o. B. keinerlei Bakterien.
e) „ „ „ „

Kulturen und Bouillon-Passagen.

Platte a sofort geimpft: am 1. X. 31
beobachtet nach 2 Tagen „ 1. X. 31
„ „ 5 „ „ 6. X. 31 } steril
„ „ 8 „ „ 9. X. 31

Bouillonkölbchen Nr. 1 angelegt am 1. X. 31
nach 8 Tagen überimpfen auf Platte b und Bouillonkölbchen Nr. 2

Platte b von Bouillonkölbchen Nr. 1: 8. X. 31
beobachtet nach 2 Tagen 10. X. 31
„ „ 5 „ 13. X. 31 } steril
„ „ 8 „ 16. X. 31

Bouillonkölbchen Nr. 2: 8. X. 31 steril
am 15. X. 31 Platte c angelegt

Platte c von Bouillonkölbchen Nr. 2

beobachtet nach 2 Tagen 17. X. 31
„ „ 5 „ 20. X. 31 } steril
„ „ 8 „ 23. X. 31

Schrägagar von Bouillonkölbchen Nr. 2 angelegt bleibt nach 8 Tagen:
makroskopisch: steril,
mikroskopisch: steril.

Die Technik bei der Beimpfung der Agarplatte (Platte a) und beim Übergießen der restlichen Leukocytenschicht in das Bouillonkölbchen zur Anzüchtung etwa vorhandener Keime wurde bereits geschildert. Während der Bebrütung bei 27° C beobachtete ich dann Platte a und Kölbchen Nr. 1 nach 2, 5 und 8 Tagen und untersuchte im Bedarfsfall im gefärbten Ausstrichpräparat bezw. hängenden Tropfen. Die hierbei festgestellten spalthefeverdächtigen Elemente wurden auf Schrägagar anzuzüchten versucht und anschließend makroskopisch auf ihre Kulturbeschaffenheit, mikroskopisch auf ihre morphologischen Eigenschaften geprüft.

Ohne Berücksichtigung der Frage, ob die Primärimpfungen zu einem Spalthefe-positiven oder verdächtigen Ergebnis führten oder nicht, wurde in jedem Fall — da nach Benedeks Angaben noch nach mehreren Passagen Spalthefewachstum auftreten kann — weitergeimpft, d. h. nach kräftigem Umschütteln des Bouillonkölbchens Nr. 1 aus diesem eine zweite Agarplatte (Platte b) beimpft und ein Teil in das Bouillonkölbchen Nr. 2 — ebenfalls mit 30 ccm steriler

5%iger Glukosebouillon gefüllt — übergegossen. Platte b und Bouillonkölbchen Nr. 2 wurden dann in gleicher Weise wie die Primärimpfungen nach 2,5 und 8 Tagen makroskopisch und mikroskopisch untersucht, verdächtige Befunde zur Anzüchtung auf Schrägagar übergeimpft; anschließend wurde am 8. Tag aus Bouillonkölbchen Nr. 2 Platte c beimpft und diese nach 2, 5 und 8 Tagen kontrolliert. Die Fälle nun, bei denen sämtliche Züchtungsversuche (Platte a, b und c, Bouillonkölbchen Nr. 1 und 2, evtl. Schrägagarröhrchen) zu keinem Ergebnis geführt hatten, wurden mit der Bezeichnung „steril ohne Spalthefe" als beendigt angesehen.

So konnten wir von 57 Fällen 37 ohne jeglichen positiven oder verdächtigen Befund abschließen. Bei 20 Fällen jedoch kamen bewegliche und unbewegliche, sporenhaltige und sporenlose, plumpe und schlanke Stäbchen zur Anzüchtung. Als Nebenbefund sahen wir hier mehrfach verschiedene groß- und kleinzellige, teils runde, teils ovale Hefearten in weißlichen oder gelblichen Kolonien, ganz vereinzelt auch Staphylokokken, ferner in 6 Fällen Penicillium glaucum zum Wachstum kommen. Eine genauere Untersuchung der verschiedenen Hefearten wurde nicht vorgenommen, da wir diese wie auch die Schimmelpilzbefunde mit Sicherheit auf eine Verunreinigung von außen her zurückführten. Die Einteilung der gezüchteten bazilliformen Gebilde wurde lediglich nach wesentlichen morphologischen Unterschieden vorgenommen, da eine genaue Klassifizierung wegen des Formenreichtums der verschiedenen festgestellten Stäbchen und ohne weitere hierzu notwendige Untersuchungsmaßnahmen nicht exakt durchzuführen war, vor allen Dingen aber auch, weil uns ein sicheres Ausschließen der Spalthefe im einzelnen Fall im Zusammenhang unserer Aufgabe vollauf genügen konnte. Trotz der durch den mannigfaltigen Formenunterschied bedingten Schwierigkeiten gelang uns bei der Untersuchung im hängenden Tropfen und im Färbepräparat eine einwandfreie Trennung der gefundenen Stäbchen in folgende Gruppen:

I.

bewegliche, sehr schlanke, nicht sporenhaltige Stäbchen, festgestellt in 8 Fällen, hiervon 4 mal direkt in der Primärimpfung (auf Platte a)

1. Fall Nr. 18 aus Bouillonkölbchen 1 nach 8 Tagen auf Schrägagar,
2. „ „ 24 „ „ 1 „ 8 „ „ „
3. „ „ 25 auf Platte a
4. „ „ 26 „ „ c aus Bouillonkölbchen 2
5. „ „ 30 „ „ a
6. „ „ 44 „ „ a
7. „ „ 46 „ „ a
8. „ „ 49 aus Bouillonkölbchen 2 auf Schrägagar.

II.

unbewegliche, ebenfalls sehr schlanke und nicht sporenhaltige Stäbchen, beobachtet in 2 Fällen, jedoch niemals direkt aus der Leukocytenschicht gezüchtet

1. Fall Nr. 35 aus Bouillonkölbchen 1 nach 8 Tagen auf Schrägagar,
2. „ „ 46 auf Platte c.

sporenhaltige, teils unbewegliche, teils schwach bewegliche, schlanke und dicke Stäbchen, die wir als Spalthefeverdächtig ansehen mußten, da ihre morphologischen Merkmale zum Teil mit denen der Spalthefe übereinstimmten. Diese Stäbchen wurden in 10 Fällen gefunden. Eine Anzüchtung direkt aus der Leukocytenschicht (auf Platte a) gelang nur bei 2 Fällen.

1.	Fall	Nr.	3	auf	Platte	a					
2.	„	„	7	„	„	c,					
3.	„	„	14	aus	Bouillonkölbchen	1	nach	8	Tagen	auf	Schrägagar,
4.	„	„	16	„	„	1	„	8	„	„	„
5.	„	„	20	„	„	1	„	8	„	„	„
6.	„	„	27	„	„	1	auf	Platte	b,		
7.	„	„	28	„	„	1	nach	8	Tagen	auf	Schrägagar,
8.	„	„	29	auf	Platte a,						
9.	„	„	36	aus	Bouillonkölbchen	1	nach	8	Tagen	auf	Schrägagar,
10.	„	„	50	„	„	1	„	8	„	„	„

Die in den Gruppen I und II aufgeführten Fälle konnten wir als einwandfrei „Spalthefe-negativ" abschließen, da bei keinem der hier gezüchteten Stäbchen eine Sporenbildung nachzuweisen war.

Weit mehr mußten uns jedoch die unter III festgelegten Befunde interessieren, da sie durch ihren Sporengehalt, fehlende bezw. nur angedeutet vorhandene Lokomotion, ferner durch ihre Form in mehreren Merkmalen große Ähnlichkeit mit der Benedek'schen Spalthefe aufwiesen. Nach häufigen, während einer sich über mehrere Wochen erstreckenden Beobachtungszeit vorgenommenen makroskopischen und mikroskopischen Untersuchungen der Kulturen mußten wir 2 von den 10 gezüchteten Stämmen (Fall 7 und Fall 29) als einwandfrei identisch mit dem von Benedek beschriebenen Schizosaccharomyces hom. bezeichnen. Die Identifizierung der übrigen 8 Stämme mit schon bekannten Bakterienarten bot selbst nach Anwendung weiterer umfangreicher kultureller Untersuchungsmaßnahmen und bei eingehender mikroskopischer Beobachtung noch manche Schwierigkeiten; insbesondere konnten uns die den Sporenträgern eigentümlichen, auch bei den von uns gezüchteten Stämmen häufig festgestellten Schwankungen in der Koloniebeschaffenheit, in der Beweglichkeit und Färbbarkeit der einzelnen Stäbchen sowie in der Größe der Stäbchen und Sporen nur zu einer Wahrscheinlichkeitsdiagnose berechtigen.

So bezeichneten wir — unter Berücksichtigung weitgehender Übereinstimmung — die in 4 Fällen gezüchteten sporenhaltigen Stäbchen als wahrscheinlich identisch, zum mindesten nahe verwandt mit dem von Meyer und Gottheil beschriebenen Bazillus simplex, in 2 Fällen als identisch oder nahe verwandt mit Bazillus vulgatus (Flügge); die bei den restlichen 2 Fällen gefundenen Sporenträger mußten wir als identisch (bezw. nahe verwandt) mit Bazillus subtilis (Cohn) ansehen.

Kritische Beurteilung der Versuchsergebnisse.

Bei oberflächlicher Beurteilung unserer Befunde, d. h. ohne Berücksichtigung der zahlreich vorhandenen Verunreinigungsmöglichkeiten müßten wir zu dem Schluß kommen, daß es möglich ist, in der Leukocytenschicht des Nabelschnurblutes mikroskopisch Stäbchen und Hefen nachzuweisen; ferner würde sich als feststehende Tatsache die Möglichkeit der Züchtung von verschiedenen Mikroorganismen (Stäbchen, Hefen und Staphylokokken) aus der Leukocytenschicht des Nabelschnurblutes ergeben. Mit anderen Worten: unsere Versuchsergebnisse würden die bisherige allgemeine Annahme der Sterilität des menschlichen Blutes völlig umstoßen. Folgende Frage rückt somit in den Vordergrund unserer Betrachtungen: Welche Verunreinigungsmöglichkeiten kommen zur Erklärung für die von uns erhobenen mikroskopischen und kulturellen Befunde als Fehlerquellen in Frage?

An erster Stelle möchte ich hier die Möglichkeit der Verunreinigung durch Luftkeime, insbesondere durch die in der Luft zahlreich vorhandenen bazilliformen Gebilde und Hefen erwähnen. Diese Verunreinigungsmöglichkeit ist bei der Anfertigung und beim Trocknen der Ausstriche, wie bereits ausführlich dargelegt, in besonderem Maße gegeben und in gleicher Weise bei den Plattenkulturen und bei der Bouillonanreicherung in Betracht zu ziehen.

Eine weitere wesentliche Fehlerquelle ist in folgendem zu sehen: Bei der Auffüllung des Citratröhrchens mit Nabelschnurblut aus dem plazentaren Teil der Nabelschnur besteht die Wahrscheinlichkeit, daß von dem der Außenfläche der Nabelschnur anhaftenden Scheidensekret geringe Mengen mit in das Citratröhrchen gelangen und so sich mikroskopisch und kulturell — insbesondere bei mehrfachen Bouillonpassagen — positive bakterielle Befunde ergeben müssen. Einen interessanten Aufschluß in dieser Richtung brachten uns die an einer Reihe schwangerer Frauen vorgenommenen Scheidensekretuntersuchungen. In fast sämtlichen Fällen sahen wir schon nach kurzer Zeit in der Bouillonanreicherung vorwiegend bewegliche und unbewegliche, sporenhaltige und sporenlose Stäbchen zum Wachstum kommen. Da nun weder von Benedek noch von uns eine genügende Desinfektion an der Durchtrennungsstelle der Nabelschnur vorgenommen wurde, ist mit großer Wahrscheinlichkeit ein Teil unserer sowie der Benedek'schen Befunde auf diese naheliegende Verunreinigungsmöglichkeit zurückzuführen.

Daß auch die Citratlösung als Fehlerquelle in Betracht zu ziehen ist, wurde bereits von Engelhardt in einer früheren Mitteilung nachdrücklich betont. Mehrfach fanden wir bei unseren Kontrollversuchen in der von der Anstaltsapotheke als steril gelieferten Citratlösung nach der Bebrütung in steriler Glukosebouillon neben sporenlosen, beweglichen Stäbchen auch unbewegliche Sporenträger. Einen eindeutigen Beweis für das massenhafte Vorkommen bazilliformer Elemente jeglicher Art in unserer Umgebung brachte uns

schließlich folgende Versuchsreihe: Sämtliche zur Herstellung des Glukoseagars und der Glukosebouillon dienenden Stoffe (Leitungswasser, Pepton, Glukose, Standard-Nährbouillon, Agar) zeigten nach der Bebrütung 27° C in steriler 5%iger Glukosebouillon ein reichliches Wachstum von Stäbchen, die wir zum Teil sogar als Spalthefeverdächtig bezeichnen mußten.

Bei kritischer Bewertung unserer Ergebnisse und unter Berücksichtigung der dargelegten Fehlerquellen komme ich zur Ablehnung der von Benedek aufgestellten Behauptung, im Nabelschnurblut in 100% den von ihm beschriebenen Erreger nachweisen zu können. Unsere, wie auch die Befunde Benedeks sind erklärt durch die zahlreichen Verunreinigungsmöglichkeiten.

Zusammenfassung.

In einer Versuchsreihe von 57 Fällen gelingt unter Einhaltung der von Benedek vorgeschriebenen Bedingungen bei 2 Fällen der kulturelle, bei 2 weiteren Fällen der färberische Nachweis der von Benedek beschriebenen Spalthefe. Sämtliche festgestellten bakteriellen Gebilde sind auf Verunreinigungsmöglichkeiten zurückzuführen. Die Berechtigung zu einem Zweifel an der Sterilität des menschlichen Blutes ist somit in keiner Weise gegeben, d. h. ein Endoparasitismus zwischen dem Benedek'schen Erreger bezw. den von uns gefundenen Keimen und dem Menschen liegt nicht vor.

Zum Schluß möchte ich Herrn Professor Dr. Schreus für die Überlassung der Laboratoriumseinrichtungen, Herrn Privatdozent Dr. Engelhardt für die liebenswürdige Anleitung bei dem experimentellen Teil der Arbeit meinen verbindlichsten Dank aussprechen.

LITERATUR-VERZEICHNIS

Über Schizosaccharomykose, eine neue Hefepilzerkrankung, verursacht durch eine neu entdeckte Spalthefe (Schizosaccharomyces nov. spec.). Von T. Benedek, Leipzig. Archiv für Dermatologie und Syphilis. Band 152, H. 1.

Weitere Beiträge zur Klinik der Schizosaccharomykosis hominis. Benedek, Leipzig. Archiv f. Dermatol. u. Syphilis. Bd. 155 (Kongreßbericht).

Schizosaccharomyces hominis nov. spec., die erste menschenpathogene Spalthefe. Von T. Benedek, Leipzig. Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. 104. Band.

Über immunobiologische Vorgänge bei der Schizosaccharomykose (Spalthefemykose). Von T. Benedek, Leipzig. Acta Dermato — Venereologica 1928, Juni.

Ein Fall von Schizosaccharomykose von T. Benedek und Prof. Dr. R. Frühwald. Dermatologische Wochenschrift. 1928 Nr. 40 (Bd. 87).

Über Schizosaccharomykose (Spalthefemykose). Archiv für Dermatol. und Syphilis. 156. Band, 1. Heft. T. Benedek.

Über experimentelle Schizosaccharomykose. T. Benedek. Dermatologische Wochenschrift. Nr. 49 (Bd. 87).

Über die Blutkulturen des Schizos. homin. (Demonstrationsvortrag) Benedek, Leipzig. Archiv für Dermatol. u. Syph. 160. Band (Kongreßbericht).

Bemerkungen zum Züchtungsverfahren des Schizosaccharomyces hominis Benedek, 1927. Von T. Benedek, Leipzig. Acta Dermato — Venereologica April, 1931.

Über Schizosaccharomykose. Eine Synthese. Benedek, Leipzig VIIIe Congrès international de Dermatologie et de Syphiligraphie. Copenhague 5 August 1930.

Ekzema Seborrhoicum Unna oder Schizosaccharomykosis Benedek? I. Mitteilung. Von W. Engelhardt und K. Nicolai. Archiv für Dermatol. u. Syph. 157. Band, 3. Heft. II. W. Engelhardt und Schneider 157. Band, Heft 3. III. W. Engelhardt u. H. Geißler. 158. Band, 2. Heft.

Über miliare Lebernekrosen bei Säuglingen. Von D. W. Iff. Abdruck aus Beiträge zur pathologischen Anatomie und zur allgemeinen Pathologie. 1931 Band 86.

Über disseminirte, miliare, nicht syphilitische Lebernekrosen bei Kindern (mit eigenartigen, argentophilen Bakterien). Von Dr. Paul Schneider. Sonderabdruck aus Virchows Archiv für pathologische Medizin. 219. Band, 1915.

Über Schizosaccharomyces hominis Benedek. Von C. Dorrepaal. Sonderabdruck aus dem Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. 1930, Bd. 82.

Eczema seborrhoicum Unna oder Schizosaccharomycosis Benedek. IV. Mitteilung. Über das Vorkommen von Spalthefen im strömenden Blut. Von W. Engelhardt. V. Mitteilung. Über das Vorkommen von Spalthefen im Nabelschnurblut. Von W. Engelhardt. VI. Mitteilung. Über das Vorkommen von Spalthefen im Inhalt von Hautblasen. Von W. Engelhardt.

LEBENSLAUF

Geboren am 28. Mai 1907, Sohn der Eheleute Volksschullehrer Karl Holz und Ehefrau Johanna, geb. Ost, besuchte ich ab Ostern 1914 die Volksschule und ab Ostern 1917 das Königliche Hohenzollerngymnasium in Düsseldorf. Nach bestandener Reifeprüfung — Ostern 1926 — studierte ich im Sommersemester 1926 die Naturwissenschaften (Physik, Chemie und Mathematik) an der Universität Köln, im Wintersemester 1926/27 die gleichen Fächer an der Universität Bonn. Zum Sommersemester 1927 ließ ich mich dann in die medizinische Fakultät der Universität Bonn umschreiben und legte hier mit Genehmigung des Herrn Ministers für Volkswohlfahrt, der mir die beiden naturwissenschaftlichen Semester für 1 medizinisches Semester in Anrechnung brachte, am 28. Februar 1929 die ärztliche Vorprüfung ab.

Die klinischen Semester studierte ich ausschließlich an der Medizinischen Akademie in Düsseldorf.

Nach meiner am 28. Mai 1932 an der Medizinischen Akademie in Düsseldorf bestandenen ärztlichen Prüfung war ich vom 1. Juni 1932 bis 1. Juni 1933 als Medizinalpraktikant an der Klinik für Innere und Nervenkrankheiten am St. Johanneshospital in Dortmund tätig; zur Zeit bin ich an der gleichen Klinik als Volontärarzt angestellt.